

(19) **RÉPUBLIQUE FRANÇAISE**
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) **N° de publication :**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 649 012

(21) **N° d'enregistrement national :**

89 08917

(51) **Int Cl^s : A 61 K 39/39, 9/113.**

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) **Date de dépôt : 3 juillet 1989.**

(30) **Priorité :**

(43) **Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 1 du 4 janvier 1991.**

(60) **Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :**

(71) **Demandeur(s) : Société d'Exploitation de Produits pour
les Industries Chimiques S.E.P.I.C., Société anonyme. —
FR.**

(72) **Inventeur(s) : Bernard Brancq ; Gérard Trouvé.**

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.**

(54) **Emulsions multiphasiques injectables.**

(57) **La présente invention concerne des émulsions injectables
multiphasiques de type E/H/E/ utilisables comme vaccins, ou
véhicules de principes actifs en médecine vétérinaire ou hu-
maine, pharmaceutiquement acceptables pour chacun de leurs
composants, stables au moins 12 mois au stockage à 4 °C, de
viscosité inférieure à 300 mPas et comprenant au moins les
constituants suivants :**

- un adjuvant huileux composé de :
 - . une phase huileuse immiscible à l'eau représentant 20 à 70 % de la formule
 - . un système émulateur choisi de façon telle que le point d'inversion de l'émulsion obtenue soit compris entre 25 et 45 ° et représentant de 2 à 10 % de la formule
- une phase aqueuse contenant les antigènes ou les principes actifs et représentant de 20 à 78 % de la formule et obtenue en une seule opération de mélange.

FR 2 649 012 - A1

EMULSIONS MULTIPHASIQUES INJECTABLES

05 La présente invention concerne des émulsions multiphasiques utilisables pour l'administration de principes actifs ou d'antigènes par voie injectable ; ces émulsions constituent de nouveaux véhicules bien tolérés qui permettent une libération progressive des principes actifs ou des antigènes.

10 Une application particulière de la présente invention concerne des vaccins multiphasiques, les adjuvants d'immunité qu'ils contiennent et leur procédé de préparation.

15 Les adjuvants d'immunité sont des produits qui augmentent les réactions du système immunitaire lorsqu'ils sont administrés en présence d'antigènes d'origine virale, bactérienne ou synthétique : ils provoquent l'apparition massive de macrophages au site d'injection, dans les nodules lymphatiques, accroissent la production d'immunoglobulines spécifiques (anticorps) et stimulent de nombreuses cellules impliquées dans les mécanismes de défense immunitaire.

20 Parmi ces adjuvants, il est reconnu que ceux résultant de l'association d'une huile minérale et d'un ester de mannitol, contenant ou non une mycobactérie tuée, connus sous le nom d'adjuvants de Freund (IFA), sont les plus efficaces.

25 Les vaccins réalisés par mélange en part égale d'adjuvant de Freund et de milieu antigénique restent la référence dans le monde entier pour des études immunologiques de laboratoire. Ils se présentent sous forme d'émulsions à phase continue huileuse (E/H), très visqueuses (de l'ordre de 5000 cPs à 20°C), donc difficilement injectables et de plus peu stables : des déphasages sont observés au bout de quelques jours.

30 Ces vaccins sont très mal tolérés et provoquent, au niveau du site d'injection chez les animaux, des réactions locales très importantes avec oedèmes, abcès et nécroses, inacceptables par les autorités sanitaires et qui rendent la viande des animaux de boucherie impropre à la consommation.

Chez les humains, des vaccins anti-diphtériques réalisés avec de l'adjuvant de Freund complet ont provoqué des intolérances sévères, voire même des avortements.

05 Afin d'améliorer l'injectabilité de ces vaccins, un procédé consistant à les redisperser dans une phase aqueuse contenant un agent tensioactif hydrophile (Polysorbate 80) a été décrit par HERBERT (Thé LANCET 16, 771, 1965).

Les émulsions doubles obtenues sont fluides, mais leur stabilité n'est que de quelques jours.

10 Le tensioactif hydrophile utilisé est toxique vis-à-vis des cellules puisqu'il est largement utilisé par ailleurs en biologie pour délipider des membranes cellulaires.

15 La préparation de ce type d'émulsions multiples est délicate : elle dépend non seulement de la composition des phases mais aussi du mode opératoire : en utilisant le mode d'agitation par ultrason décrit par HERBERT, des auteurs ont obtenu une émulsion multiple par sonication pendant 10s, alors que la même formule est de type E/H si la sonication est poursuivie 30s.

20 Une aussi grande variabilité sur les paramètres du procédé, qui, de plus, nécessite deux étapes, est difficilement acceptable à l'échelle industrielle.

25 Du point de vue immunitaire, les vaccins obtenus par ce procédé se sont avérés moins performants que des vaccins de type E/H. (ANDERSON. Res. Vet. Sci 12, 18, (1971) HERBERT. Immunological standardization. Symposium series 6, 29, (1967)).

30 Il serait donc intéressant de disposer d'émulsions fluides, facilement injectables, stables, de type E/H/E à température ambiante qui pourraient se transformer, à la température du corps humain ou animal, en une préparation de type E/H plus efficace.

35 Cette transformation, appelée inversion de phase, a été largement étudiée par SHINODA et son équipe. La température à laquelle se produit le passage de la forme E/H à la forme E/H/E est la température d'inversion de phase. Elle est déterminée par suivi de la conductivité électrique d'une émulsion fabriquée à chaud et refroidie dans un bain de glace.

L'inversion de phase se produit avec de nombreux tensio-actifs non ioniques mais a été étudiée surtout sur des produits de type alkyl phénol éthoxylé, incompatibles avec un usage médical ou vétérinaire.

05 Les émulsions, objets de la présente invention, sont fabriquées en une seule opération, à partir d'émulgateurs pharmaceutiquement acceptables qui, dissous dans une huile injectable, forment une phase homogène limpide et ont des points d'inversion
10 plus été observé, de façon tout à fait inattendue, que ces vaccins sont très bien tolérés et ne provoquent pas de réactions locales, abcès ou nécroses comme le font les vaccins de type E/H réalisés à partir de la même huile.

15 Caractérisation des émulsions selon l'invention

Les émulsions obtenues sont caractérisées par les propriétés suivantes :

- fluidité : mesurées avec un appareil BROOKFIELD à 20°C, les viscosités sont toujours inférieures à
20 300 mPas, généralement inférieures à 100 mPas
- injectabilité : les émulsions s'écoulent facilement hors d'une seringue de 10 ml munie d'une aiguille de diamètre 0,8 mm et soumise à une force constante de 3,3 kg.

25 Le temps nécessaire à l'écoulement de 10 ml d'émulsion est comparable à celui d'une formule H/E et nettement plus faible que celui d'une émulsion avec l'adjuvant de Freund.

30	Emulsion	Temps d'écoulement (s)
	selon l'invention (E/H/E)	9
	H/E	6,5
35	contenant IFA (E/H)	59

- conductivité : elle détermine le caractère de la phase continue de l'émulsion. Elle est généralement comprise entre 0,1 et 10 millisiemens à froid, entre 0,05 et 5 microsiemens à chaud
- 05 - dispersibilité dans l'eau : les émulsions obtenues selon l'invention se dispersent facilement dans l'eau avec laquelle elles forment une solution laiteuse avec une pellicule huileuse
- 10 - aspect microscopique : les émulsions selon l'invention ont des tailles de gouttes huileuses inférieures ou voisines de 1 μ m.

Les microgouttes de phase aqueuse dans ces gouttes huileuses sont invisibles au microscope optique. Ces tailles de particules, très faibles comparativement à celles des formules type HERBERT, expliquent la bonne stabilité des émulsions de vaccins de l'invention :

- stabilité : les émulsions selon l'invention sont stables au moins 12 mois à 4°C.

Pour déterminer si un mélange d'huile, d'émulgateurs et de milieu antigénique mis sous agitation, selon le mode opératoire de l'invention, a permis la réalisation d'une émulsion multiple, il suffit de faire tomber quelques gouttes de la préparation obtenue dans un récipient d'eau et d'agiter doucement avec une spatule.

Une émulsion du type eau dans l'huile donne des gouttes blanches distinctes qui vont rapidement se regrouper et surnager à la surface de l'eau.

Une émulsion du type huile dans l'eau donne un lait de couleur et d'aspect homogènes.

Une émulsion multiple donne à la fois un lait homogène et des gouttelettes surnageant à la surface de l'eau.

Caractérisation des huiles contenues dans les émulsions injectables

Les huiles doivent être dépourvues de toxicité et donner des émulsions fluides au stockage à 4°C.

Elles sont choisies parmi les huiles minérales, végétales ou animales connues pour leur faible toxicité. On choisira des

huiles minérales à chaînes linéaires ayant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 16 et exemptes de composés aromatiques.

Des exemples connus sont le MARCOL 52 (produit par ESSO France) ou le DRAKEOL 6VR (produit par PENRECO USA).

05 On peut également utiliser des hydrocarbures de synthèse tels que le polyisobutène ou le polyisoprène.

Pour les huiles végétales, on choisira des huiles insaturées de type oléique qui sont biodégradables et connues pour leur pouvoir immunogène, par exemple les huiles d'arachide, 10 d'olive, de sésame, de soja, de germe de blé, de jojoba, etc...

Pour les huiles animales, les mêmes critères de tolérance et d'efficacité immunologiques permettent d'utiliser par exemple du squalène, du squalane, de l'huile de spermaceti.

15 Des esters d'acides gras ayant au moins 14 atomes de carbone et d'alcool, de préférence ramifiés, liquides à la température de stockage peuvent également être utilisés.

Caractérisation des émulseurs

20 Ce sont des produits non ioniques dépourvus de toxicité notable, utilisables par voie injectable, qui peuvent être choisis dans les classes chimiques ci-dessous, citées à titre d'exemples non limitatifs :

- esters ou éthers d'acide gras et de sucre (SORBITOL, MANNITOL, SACCHAROSE, GLUCOSE...)
- 25 - esters d'acide gras et de glycérol ou de polyol
- dérivés hydrophiles de ces esters obtenus par greffage de fonctions alcool, éther-oxyde, carboxylique, amine, amide...
- lécithines
- 30 - acides ou alcools gras condensés avec de l'oxyde d'éthylène et ou de propylène.

Les chaînes grasses des émulseurs utilisés auront de 8 à 22 atomes de carbone, de préférence de 14 à 20 atomes de carbone. Les chaînes liquides sont préférées.

Les alcools et acides oléique, ricinoléique, linoléique, isostéarique, céstéarique et leurs dérivés sont des composés de choix.

05 Les émulseurs de la famille des oléates de mannitol sont particulièrement intéressants du fait de leur bonne innocuité et de leur aptitude à former des émulsions multiphasiques très stables. Des dérivés d'oléate de mannitol obtenus par greffage de fonctions hydrophiles telles que, par exemple, des fonctions amine, amide, éthoxy, alcool, polyol, carboxylique... peuvent être
10 avantageusement utilisés.

Des adjuvants d'immunité prêts à l'emploi comprenant l'huile et les émulseurs et se présentant sous forme d'un liquide huileux limpide, stable et homogène constituent le mode de mise en oeuvre préféré des émulseurs utilisés dans l'invention.

15

Procédé par l'obtention de vaccins multiphasés de type E/H/E

Il est important pour obtenir des vaccins très stables de les fabriquer en suivant la procédure suivante :

- 20 - porter la phase huileuse (huile et émulseurs) d'une part et la phase aqueuse contenant les antigènes ou les principes actifs d'autre part à la même température choisie entre 20 et 40°C. Une température de 30°C est souvent optimale
- 25 - verser la phase aqueuse dans la phase huileuse sous agitation modérée non cisaillante et agiter jusqu'à retour à la température ambiante.

Des formulations stables plus d'un an à 4°C et à température ambiante sont obtenues par ce procédé.

30

Exemple 1

On réalise un vaccin ayant la composition suivante :

Adjuvant huileux	50 %
Solution tampon d'albumine bovine	50 %
à 100 µg/ml	

35

La composition de l'adjuvant huileux est choisie pour que le point d'inversion de l'émulsion soit de 35°C environ.

Les caractéristiques de cet adjuvant et du vaccin correspondant sont mentionnées dans le tableau 1 - 1.

05 Ce vaccin est injecté par voie sous-cutanée à des souris SWISS. L'évolution du taux d'anticorps (moyenne sur 10 souris) déterminée par une technique ELISA est donnée dans le tableau 1 - 2.

10 A titre de comparaison sont mentionnées également dans ce tableau les évolutions des taux d'anticorps observés pour un vaccin fabriqué avec de l'adjuvant de Freund incomplet (IFA) et pour une solution tampon d'albumine sans adjuvant d'immunité.

15 Le vaccin décrit dans cet exemple permet d'augmenter de façon significative et durable le taux d'anticorps chez la souris comparativement à un vaccin non adjuvé, sans toutefois atteindre les performances du vaccin contenant l'IFA.

TABLEAU 1 - 1
CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU VACCIN BSA

20	<u>Caractéristiques de l'adjuvant</u>		
25	ASPECT	huile limpide de couleur jaune paille	
	COMPOSITION	huile minérale fluide	86 %
		ester oléique d'anhydro-	14 %
		mannitol et de PEG * 500	
30	Indice d'acide	0,15	
	Indice d'hydroxyle	18	
	Indice de saponification	15	
	Indice de réfraction	1,461	
	Viscosité	25 mPas	

* PEG : polyéthylèneglycol

TABLEAU 1 - 1 (suite)

05

Caractéristiques du vaccin (à 20°C)

10

Type	E/H/E
Taille de particule	<1 µm
Conductivité	1,0 mS
Viscosité	50 mPas
Stabilité 4°C	> 12 mois.

15

TABLEAU 1 - 2

TAUX D'ANTICORPS ANTI BSA (EXPRIME EN INVERSE DE LA DILUTION
NECESSAIRE POUR OBTENIR UNE DENSITE OPTIQUE EGALE A 1)

20

25

30

35

JOURS APRES VACCINATION	14	28	56	125
VACCIN SELON EXEMPLE 1	95	1295	2785	2225
VACCIN SUR IFA	475	7560	17280	25600
ALBUMINE SANS ADJUVANT	60	157	102	105

Exemple 2

Un vaccin contre la grippe est testé chez la souris SWISS. Il a pour composition :

05 adjuvant huileux (huile minérale contenant des esters
 oléiques de PEG 500 et : 47 %
 d'anhydromannitol)
 milieu antigénique : 53 %

10 Le milieu antigénique est constitué d'un virus
Influenza A/PR8 inactivé au formol titrant 800 unités hémagglu-
tinantes/ml.

 L'adjuvant et le vaccin ont sensiblement les mêmes
caractéristiques physico-chimiques que celles de l'exemple 1. Le
15 point d'inversion du vaccin est 37°C.

 La vaccination est effectuée au moyen d'une injection
unique de 0,2 ml par voie sous-cutanée.

 Le tableau 2 donne les résultats d'un dosage d'anticorps
(exprimé en log₂ des dilutions). On peut y constater que le vaccin
20 multiphasique est aussi performant que le vaccin correspondant sur
IFA et nettement plus efficace que le vaccin témoin non adjuvé.

TABEAU 2PERFORMANCE D'UN VACCIN GRIPPAL MULTIPHASIQUE

25

30

35

VACCIN	TAUX D'ANTICORPS 42 j après vaccination
multiphasique	4,3
adjuvé IFA	4,9
non adjuvé	3,1

Exemple 3

05 Deux vaccins contre la maladie d'AUJESZKY ont été formulés à partir du même milieu antigénique. L'un est un vaccin huileux classique de type E/H (3A), l'autre est un vaccin multiphasique E/H/E selon l'invention (3B).

10 Les adjuvants contenus dans ces deux vaccins sont basés sur une huile de synthèse liquide, obtenue par polymérisation de l'isobutylène. Le vaccin multiphasique contient un système émulateur lui conférant un point d'inversion de 33°C environ.

Les caractéristiques des vaccins et de leurs adjuvants sont données dans le tableau 3 - 1.

TABLEAU 3 - 1

FORMULE	3A	%	3B	%
<u>CARACTERISTIQUES DE</u> <u>L'ADJUVANT</u> Aspect Huile Emulgateur Indice d'acide Viscosité 20°C	Limpide, jaune clair polyisobutène monooléate de mannitol 0,12 50 mPas	88 % 12 %	Limpide, jaune clair polyisobutène monooléate de mannitol PEG 10 oléate 0,15 60 mPas	85 % 7,5 % 7,5 %
<u>CARACTERISTIQUES DU</u> <u>VACCIN A 20°C</u> Viscosité Taille de gouttes Conductivité Type Stabilité 4°C	100 mPas 1 à 5 µm 0,15 µS E/H > 12 mois		88 mPas 1 µm 3,9 mS E/H/E > 12 mois	

Deux lots de chacun 6 porcs charcutiers placés en élevage industriel ont été vaccinés. La vaccination a été effectuée par injection intramusculaire de 2 ml de vaccin suivie d'un rappel à 15 jours. Les taux d'anticorps ont été estimés par séro-neutralisation, 59 jours après la première injection.

Le tableau 3 - 2 montre clairement l'intérêt du vaccin multiphasique 3B qui ne provoque que peu de réactions d'intolérance (nécrose, suppuration, fibrose, atrophie musculaire), tout en donnant une réponse immunologique positive comme l'attestent les résultats de sérologie et la présence de granulomes macrophagiques.

TABLEAU 3 - 2
RESULTATS DE VACCINATION

VACCIN	3A.	3B
<u>SEROLOGIE</u> (hémagglutination)		
taux anticorps (10g2)	2,6	1,3
<u>HISTOLOGIE</u> *		
nécrose	1/6	0/6
suppuration	3/6	0/6
fibrose	6/6	3/6
atrophie musculaire grave	2/6	1/6
granulomes macrophagiques	4/6	6/6

* fréquence des lésions observées.

EXEMPLE 4

Cette expérience met à nouveau en évidence la bonne tolérance d'un vaccin multiphasique selon l'invention comparativement à un vaccin huileux classique de type E/H formulé avec la même huile minérale.

05 Les caractéristiques des deux adjuvants huileux et des deux vaccins obtenus sont données dans le tableau 4 - 1.

Deux lots de 5 porcs charcutiers chacun placés en station d'élevage ont été vaccinés contre la maladie d'Aujeszky.

10 Deux ml de vaccin ont été administrés par voie intramusculaire à chaque animal ; un rappel a été pratiqué de la même façon 18 jours après la première vaccination. Une épreuve de résistance par pulvérisation intranasale de 4 ml d'une suspension virale infectieuse a été effectuée 32 jours après vaccination. Le

15 tableau 4 - 2 résume les résultats.

Les évolutions pondérables des deux groupes d'animaux après épreuve sont comparables et nettement supérieures à celles des témoins vaccinés non adjuvés. Les taux d'anticorps (exprimés en inverse de dilution) ne sont pas significativement différents.

20 Par contre, la tolérance du vaccin multiphasique 4B est bien meilleure : aucun abcès nécrotique ni aucune réaction locale inacceptable par les autorités sanitaires n'ont été observés.

Ceci est à rapprocher des élévations de températures modérées observées avec ce vaccin lors des 2 vaccinations.

TAB. EAU 4 - 1
CARACTERISTIQUES DES VACCINS CONTRE LA MALADIE D'ALJESZKY

FORMULE	4A	%	4B	%
<p><u>CARACTERISTIQUES DE L'ADJUVANT</u></p> <p>Huile Emulgateur</p> <p>Indice d'hydroxyle Indice d'acide Indice de saponification Indice de réfraction (25°C) Viscosité (20°C)</p> <p><u>CARACTERISTIQUES DU VACCIN</u></p> <p>Type Viscosité (20°C) Aspect microscopique Conductivité (20°C) Stabilité à 4°C Titre antigénique</p>	<p>huile minérale fluide ester d'acide oléique et de mannitol</p> <p>12 0,11 1/4 1,459 40 mPas</p> <p>E/H 25 mPas gouttes env. 1µm 0,28 µS > 12 mois 10 9 DCP 50/ml</p>	<p>89 % 11 %</p>	<p>huile minérale fluide ester oléique de mannitol et de PEG 500</p> <p>0,2 17 1,460 20 mPas</p> <p>E/H/E 112 mPas gouttes <1 µm 1,3 mS > 12 mois 10 9 DCP 50/ml</p>	<p>85 % 15 %</p>

TABLEAU 4 - 2
RESULTATS DE LA VACCINATION CHEZ LE PORC

VACCIN	4A	4B
<u>HYPERTHERMIE</u> à la vaccination au rappel à l'épreuve	+ +++ +	- + ++
<u>EVOLUTION PONDERALE MOYENNE %</u> (pendant les 7 j après épreuve) NB. Vaccin non adjuvé - 1,08	+ 0,17	+ 0,15
<u>SEROLOGIE</u> taux anticorps écart type	22,4 8,8	13,6 11,2
<u>REACTIONS LOCALES</u> abcès - nécroses suppuration	4/4 1/4	0/5 0/5
fibrose atrophie musculaire	3/4 3/4	2/5 5/5
granulomes macrophagiques	3/4	2/5

TABLEAU 5

FORMULE	32 A	%	3408	%	26 K	%
<u>CARACTERISTIQUES DE L'ADJUVANT</u> Huile Emulgateur Aspect Viscosité 20°C	minérale fluide lécithine monooléate PEG l'impide jaune 35 mPas	85 % 7,8 % 400 7,2 %	squalane ester oléique de mannitol et PEG l'impide jaune clair	85 % 400 15 %	minérale fluide ester oléique de mannitol et PEG l'impide jaune clair 30 mPas	88 % 12 %
<u>CARACTERISTIQUES DU VACCIN</u> Type % adjuvant Viscosité Conductivité Aspect microscopique (taille gouttes)	multiphasique 50 30 mPas 3 mS < 1 µm		multiphasique 50 100 mPas 2 mS 1 µm		multiphasique 70 150 mPas 1,8 mS 1 µm	

TABLEAU 5 (suite)

FORMULE	GTAF 56	%	V 7401 - 1	%	V 7401 - 2	%
<u>CARACTERISTIQUES DE L'ADJUVANT</u>						
Huile	huile d'arachide	92 %	huile minérale + arachide (1:1)	84 %	huile minérale + arachide (1:1)	87 %
Emulgateur	copolymère OE/OP	8 %	ester d'acide oléique et de mannitol	16 %	ester d'acide oléique et de mannitol+lécithine	13 %
Aspect	jaune clair		limpide jaune paille		limpide jaune	
Viscosité 20°C	50 mPas		45 mPas		50 mPas	
<u>CARACTERISTIQUES DU VACCIN</u>						
Type	multiphasique		multiphasique		multiphasique	
% adjuvant	65		64		60	
Viscosité	1800 mPas		450 mPas		100 mPas	
Conductivité	1,9 mS		2 mS		2 mS	
Aspect microscopique (taille gouttes)	1 µm		1 µm		1 µm	

Exemple 5

On décrit dans cet exemple des émulsions placebos et des adjuvants correspondants (tableau 5) qui ont tous pour caractéristiques :

- 05 - faible viscosité
- bonne injectabilité
- inversion vers 30 - 40°C
- stabilité correcte au stockage à 4°C

10 Ces exemples montrent que l'on peut réaliser des vaccins selon l'invention à partir de différentes huiles utilisables par voie injectable (minérale, végétale, squalane...) et de leurs mélanges, ainsi que différents types d'émulgateurs à condition que leur concentration soit adaptée. La quantité de phase aqueuse contenant les principes actifs peut également varier dans une large

15 proportion.

Il a cependant été remarqué que les caractéristiques des émulsions obtenues, notamment viscosité, stabilité et point d'inversion, sont très sensibles à la composition des adjuvants et à l'origine des huiles utilisées.

20

Exemple 6

Un test de tolérance à l'injection intrapéritonéale de 0,25 ml de produit a été décrit par S.S BERLIN (Annals of Allergy 20, 473 (1962)). Les vaccins selon l'invention passent tous

25 les normes de ce test (pas de mort, de péritonite, évolution pondérale comparable aux témoins).

Des tests conformes aux protocoles décrits dans la pharmacopée européenne ont montré qu'il n'existait pas de toxicité anormale dans des vaccins placebos selon l'invention, en

30 particulier pour ceux formulés à partir d'esters oléiques de mannitol et de PEG, et d'huile minérale fluide ou d'huile synthétique polyisobutylène.

Exemple 7

Cet exemple illustre l'importance du procédé de fabrication sur les propriétés physico-chimiques des vaccins multiphasiques, notamment la température de fabrication.

05

Les formules étudiées ont pour composition :

Adjuvant huileux (huile minérale 85 %, esters oléiques de mannitol et PEG 15 %) 94 g

Milieu antigénique placebo 106 g

10 Mode opératoire 1 - Les deux phases sont portées à 30°C et agitées ensembles 10 min par un agitateur YSTRAL tournant à 2500 tr/min environ.

Mode opératoire 2 - La phase huileuse est chauffée à 40°C, la phase aqueuse est maintenue à température ambiante.

15

Aspect microscopique des vaccins obtenus :

20

mode opératoire 1	mode opératoire 2
gouttes très fines ($< 1 \mu$) - homogènes	gouttes pouvant aller jusqu'à 50 μ hétérogène

REVENDECATIONS

- 05 1. Emulsions injectables multiphasiques de type E/H/E/
utilisables comme vaccins, ou véhicules de principes actifs en
médecine vétérinaire ou humaine, pharmaceutiquement acceptables
pour chacun de leurs composants, stables au moins 12 mois au
stockage à 4°C, de viscosité inférieure à 300 mPas et comprenant au
moins les constituants suivants :
- un adjuvant huileux composé de :
 - 10 . une phase huileuse immiscible à l'eau représentant 20
à 70 % de la formule
 - . un système émulateur choisi de façon telle que le
point d'inversion de l'émulsion obtenue soit compris entre 25 et
45° et représentant de 2 à 10 % de la formule
 - une phase aqueuse contenant les antigènes ou les
- 15 principes actifs et représentant de 20 à 78 % de la formule et
obtenue en une seule opération de mélange.
2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le
ou les émulateurs appartiennent à l'une des classes ci-après :
- 20 esters d'acides gras et de sorbitol
 - esters d'acides gras et de mannitol
 - esters d'acides gras et de saccharose
 - esters d'acides gras et de glycérol
 - un quelconque des esters ci-dessus condensés avec de
l'oxyde d'éthylène et/ou de propylène
 - 25 acide gras condensé avec de l'oxyde d'éthylène et/ou de
propylène
 - alcool gras condensé avec de l'oxyde d'éthylène et/ou de
propylène
 - glycéro phospholipide.
- 30 3. Composition selon l'une quelconque des revendications
1 ou 2, caractérisée en ce que les acides gras utilisés pour les
synthèses des émulateurs possèdent de 12 à 22 atomes de carbone
et en particulier sont des acides oléique, stéarique ou
ricinoléique.

05 4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'un des émulseurs utilisé est un oléate de mannitol ou d'anhydromannitol modifié ou non par greffage de fonctions hydrophiles telles que groupement carboxylique, amine, amide, alcool, polyol, éther-oxyde.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée par le fait que l'huile utilisée est une huile minérale ou un hydrocarbure de synthèse, liquide à 4°C et ayant une viscosité inférieure à 100 mPas à 40°C.

10 6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée par le fait que l'huile utilisée est une huile ou une cire liquide métabolisable d'origine végétale, vierge ou raffinée.

15 7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée par le fait que l'huile utilisée est une huile ou une cire d'origine animale, en particulier de poisson.

20 8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée par le fait que l'huile utilisée est un mélange de deux ou plusieurs des huiles décrites dans les revendications 5 à 7.

25 9. Adjuvants huileux, liquides homogènes contenant au moins l'un des émulseurs et huile décrits dans les revendications 2 à 8 et permettant d'obtenir, par agitation avec une phase aqueuse contenant un principe actif ou un antigène, une émulsion stable, de viscosité inférieure à 300 mPas fluide, de type E/H/E caractérisés par un point d'inversion compris entre 25 et 45°C.

30 10. Procédé pour la préparation de compositions injectables selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 consistant à :

- mélanger la ou les huiles et le ou les émulseurs
- stériliser cette phase par filtration, autoclavage ou tout autre moyen connu
- chauffer cette phase entre 20 et 40°C, de préférence entre 30 et 35°C

05

- préparer une solution aqueuse contenant les principes actifs ou les antigènes, stériliser cette solution aqueuse par tout moyen de stérilisation approprié
- chauffer la solution aqueuse à la même température que la phase huileuse
- ajouter la solution aqueuse dans la phase huileuse sous agitation non cisailante.